

Исследование сравнительной фармакокинетики таблетированных форм микофеноловой кислоты

Хохлов А.Л.¹, Яичков И.И.¹, Шитова А.М.², Шитов Л.Н.^{1,2},
Джурко Ю.А.², Мирошников А.Е.¹

¹ – ФГБОУ ВО «Ярославского государственного медицинского университета» МЗ РФ, г. Ярославль

² – ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», г. Ярославль

Резюме. В рамках открытого, рандомизированного, перекрёстного исследования с 14-дневным периодом отмычки, с двумя последовательностями была изучена биоэквивалентность двух таблетированных форм микофеноловой кислоты на 48 добровольцах (дозировка 360 мг). Для анализируемых препаратов рассчитаны следующие фармакокинетические параметры: AUC_{0-t} , C_{max} , T_{max} , C_{max}/AUC . 90% доверительные интервалы для отношения геометрических средних значений параметров AUC_{0-t} и C_{max} микофеноловой кислоты составили 98,97–111,49% и 121,27–153,94% соответственно. Верхняя граница доверительного интервала, соответствующего параметру C_{max} , выходит за рамки допустимого согласно протоколу исследования диапазона (75–133%), что не позволило констатировать биоэквивалентность исследуемых препаратов. Также были проанализированы возможные причины расхождений фармакокинетических параметров.

Ключевые слова: микофеноловая кислота, фармакокинетика, биоэквивалентность

A comparative study of pharmacokinetics of coated tablets of mycophenolic acid

Khokhlov A.L.¹, Yaichkov I.I.¹, Shitova A.M.², Shitov L.N.^{1,2}, Dzhurko Yu.A.², Miroshnikov A.E.¹

¹ – The Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl

² – Quinta-Analytica Yaroslavl LLC, Yaroslavl

Abstract. In a single-dose, two-treatment, two-period, two-sequence crossover study with a 14-days washout period was carried out the bioequivalence study of two tablet coated formulation of mycophenolic acid that given to 48 volunteers in equal doses (dosage 360 mg). There were calculated the followed parameters: AUC_{0-t} , C_{max} , T_{max} , C_{max}/AUC . 90% confidence interval for ratio of geometric mean AUC_{0-t} values was 98,97% – 111,49% and one for ratio of geometric mean C_{max} was 121,27% – 153,94%. The upper limit of the confidence interval of C_{max} values goes beyond the permissible range according to the protocol study (75-133%). It is not possible to state bioequivalence of drugs. Possible causes of discrepancies of pharmacokinetic parameters were analyzed.

Keywords: mycophenolic acid, pharmacokinetics, bioequivalence

Автор, ответственный за переписку:

Яичков Илья Игоревич – аспирант кафедры клинической фармакологии с курсом ИПДО ФГБОУ ВО «Ярославский государственные медицинский университет» МЗ России; 150043, Ярославль, ул. Автозаводская, д. 29, кв. 97; тел. +7 (910) 977-74-98; e-mail: ilya_1993_08@mail.ru

Введение

В настоящее время трансплантация является наиболее перспективным направлением в лечении пациентов с тяжёлыми заболеваниями внутренних органов, позволяющим увеличить продолжительность жизни, обеспечить их физическую, социальную и психологическую адаптацию. Все реципиенты почки получают длительную иммуносупрессивную терапию, целью которой является предупреждение отторжения. Повышению не только краткосрочной, но и долгосрочной выживаемости способствовало внедрение в клиническую практику новых иммуносупрессивных препаратов – производных микофеноловой кислоты, которая впервые была выделена из плесневого гриба *Penicillium glaucum* в 1889 г. Применение препаратов данной группы способствует сильному, селективному, обратимому и неконкурентному ингибированию инозинмонофосфатдегидрогеназы – фермента, необходимого для синтеза гуанозина, а также предотвращению его инкорпорации в ДНК. Таким образом, приём

микофеноловой кислоты подавляет рост и деление лимфоцитов, что приводит к подавлению продукции цитокинов и ограничивает усиление иммунного ответа. Этот эффект сопровождается снижением экспрессии определённых рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов, которые отвечают как за активацию цитокинов, так и за прямое распознавание клеток. В итоге данный препарат индуцирует апоптоз лимфоцитов, в очень низких концентрациях также подавляет *in-vitro* пролиферацию стимулированных митогенами В- и Т-лимфоцитов периферической крови человека.

В 90 гг. XX века был внедрён первый препарат микофеноловой кислоты – мофетила микофенолат, который успешно применяется в клинической практике. Однако эффективность терапии может снижаться в связи с развитием нежелательных побочных явлений, таких как гематологические, лимфопролиферативные заболевания, повышенный риск оппортунистических инфекций (цитомегаловирусной, герпесвирусной), желудочно-кишечных расстройств (тошноты, рвоты, диареи, гастрита и др.). Развитие побочных реакций

Таблица 1

Характеристика валидационных параметров методики

№ п/п	Валидационный параметр	Результаты
1	Селективность	Анализ 6 образцов бланковой плазмы крови и плазмы, содержащей аналит и внутренний стандарт, показал отсутствие интерференции в области времени удерживания микофеноловой кислоты и дейтерированного стандарта (рис. 1, 2)
2	LLOQ*	0,5 мкг/мл (точность 104,85% от теоретической, прецизионность (CV**) – 7,45%
3	Линейность	Диапазон концентраций: 0,50 – 30,00 мкг/мл. Коэффициент корреляции калибровочной кривой (r) находился в диапазоне от 0,9985 до 0,9996
4	Прецизионность и точность	Точность находилась в пределах от 99,76% до 111,38% внутри калибровочного диапазона. CV не превышал 9,01%
5	Степень извлечения	90,33%
6	Отсутствия влияния разведения	Образцы плазмы с добавлением аналита в концентрации 45,0 мкг/мл разводились в 2 раза пустой плазмой. Точность определения составила 100,16%
7	Эффект влияния матрицы	CV не превышал 11,94%
8	Стабильность	Краткосрочная (24 ч)
		99,18% от номинальной концентрации
		Долгосрочная (37 дней)
		100,38% от номинальной концентрации
		При замораживании/размораживании
		105,10% от номинальной концентрации
Примечание: *Нижний предел количественного определения; **Коэффициент вариации.		

может приводить к снижению дозы препарата, а иногда к временному прекращению приёма или полной отмене терапии. Это послужило стимулом к созданию более усовершенствованной формы доставки активно действующего вещества.

В 2002 г. в Европе был зарегистрирован микофенолат натрия, покрытый кишечнорастворимой оболочкой с целью защиты верхних отделов ЖКТ от токсического воздействия микофеноловой кислоты, в результате обеспечивая доставку активного вещества непосредственно в тонкий кишечник. В 2004 г. FDA одобрило к применению микофенолат натрия в комбинации с циклоспорином А и кортикостероидами для профилактики отторжения трансплантата после пересадки почки [1–5].

Согласно Guidelines on renal transplantation European Association of Urology 2013, в настоящее время применение микофенолатов при трансплантации почек является «золотым стандартом» [6].

Цель исследования

Целью данного исследования является оценка биоэквивалентности новой тестируемой таблетированной формы микофеноловой кислоты¹ и оригинального препарата².

¹ Производитель тестируемого препарата не разглашается из соображений конфиденциальности.

² Торговое название и производитель оригинального препарата не указан из-за соображений конфиденциальности

Методы исследования

Аналитическая методика

Оценка биоэквивалентности проводилась посредством изучения содержания микофеноловой кислоты в плазме крови испытуемых с помощью ВЭЖХ-МС/МС методики, описанной An-Sofie Decavele, Niels Favoreel, Fien Vander Heyden and Alain G. Verstraete с модификациями [7]. Для проведения анализов использовалась ВЭЖХ-МС/МС-система, оснащённая трёхквadrupольным масс-спектрометрическим детектором ThermoScientific TSQ Quantum Discovery Max. Данная методика валидирована в соответствии с требованиями Руководства по экспертизе лекарственных средств [8]. Полученные результаты валидационных тестов представлены в табл. 1.

Дизайн исследования

Исследование проводилось на 48 здоровых добровольцах в возрасте от 18 до 45 лет, соответствующих критериям включения. Дизайном исследования были предусмотрены 6 дублёров. Испытуемые были разделены на 2 группы случайным образом, согласно схеме рандомизации. Все участники тестировались на предмет употребления наркотических веществ и алкоголя. Женщинам дополнительно проводился тест на беременность. Общий анализ, биохимия крови и ЭКГ были проведены дважды: до начала исследования и после его окончания. Период между введениями препаратов составлял 14 дней. Взятие

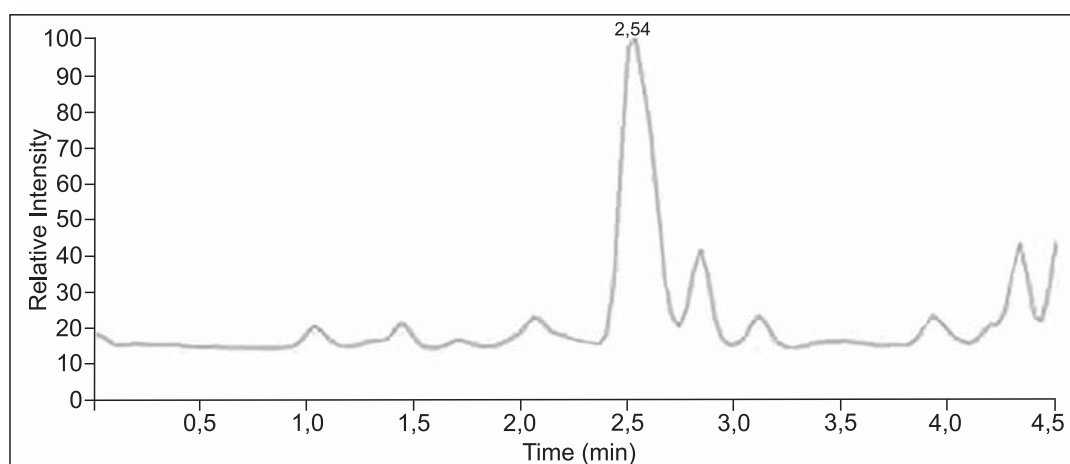


Рис. 1. Хроматограмма бланковой плазмы

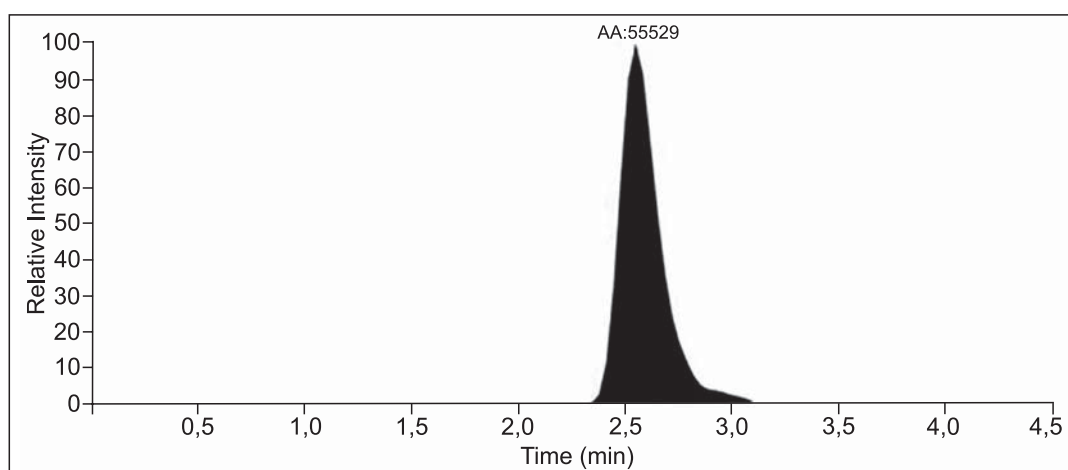


Рис. 2. Хроматограмма плазмы с добавлением микофеноловой кислоты в концентрации 0,5 мкг/мл

образцов крови для последующего количественного определения микофеноловой кислоты проводили до приёма лекарственного препарата и через 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч после приёма таблеток в дозировке 360 мг. После отбора пробирку с кровью плавно переворачивали 4–5 раз, для избежания образования сгустка и центрифугировали в течение 10 минут при скорости 2 500 об/мин. Время от момента забора крови до начала центрифугирования составляло не более 15 минут. Далее, пробирки с отобранной плазмой замораживали до температуры не выше -20°C . Всего было отобрано и проанализировано 1 536 образцов крови в течение 2-х этапов.

Статистический анализ и расчёт фармакокинетических параметров

Статистический анализ выполняли с помощью программ StatSoft STATISTICA v.12, статистического пакета R, модуль Bear (Lee, Hsin-ya and Lee, Yung-jin, bear: Data Analysis Tool for Average Bioequivalence and Bioavailability) и Microsoft Excel 2007. Для каждого

добровольца по данным зависимости концентрации микофеноловой кислоты в плазме крови от времени предполагалось рассчитать следующие фармакокинетические параметры, необходимые для оценки биоэквивалентности сравниваемых лекарственных препаратов:

- C_{\max} — максимальное измеренное значение концентрации лекарственного вещества в плазме крови добровольца;
- TC_{\max} — время достижения максимальной концентрации лекарственного вещества в плазме крови добровольца;
- AUC_{0-t} — площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени (момент приёма препарата), до времени отбора последнего отбора крови, при котором концентрация препарата равна или выше нижнего предела количественного определения;
- $AUC_{0-\infty}$ — площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени до бесконечности;
- $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ — отношение значений AUC_{0-t} к $AUC_{0-\infty}$;
- C_{\max}/AUC — относительная скорость всасывания;

• MRT — среднее время удержания ЛС в крови (среднее резидентное время).

- k_{el} — константа элиминации;
- $T_{1/2}$ — период полувыведения ЛС.

Фармакокинетические кривые микофеноловой кислоты имеют мультипиковый характер, связанный с кишечно-печёночной рециркуляцией исследуемого вещества. В связи тем, что у большинства добровольцев конечный моноэкспоненциальный участок кинетической кривой содержал менее трёх точек со значениями концентрации, равными или превышающими нижний предел количественной оценки, осуществление процедуры нелинейного регрессионного анализа для вычисления константы элиминации и связанных с ней параметров ($AUC_{0-\infty}$, $T_{1/2}$, MRT) было невозможно. По указанной причине расчёт параметров k_{el} , $AUC_{0-\infty}$, $T_{1/2}$ и MRT не был выполнен.

Значения параметров C_{max} и TC_{max} оценивали, как наибольшее из измеренных значений концентрации и соответствующее время наблюдаемого максимума. Величину AUC_{0-t} рассчитывали при помощи метода трапеций.

В предположении о лог-нормальном распределении, сравнение средних значений параметров C_{max} , AUC_{0-t} и C_{max}/AUC_{0-t} для исследуемого препарата и препарата сравнения проводилось на основе мультипликативной модели, а доверительные интервалы строились для отношений соответствующих геометрических средних значений. После проведения логарифмического преобразования эти показатели анализировались с помощью дисперсионного анализа (ANOVA; параметрический метод). Дисперсионный анализ применялся для проверки гипотез о статистической значимости вклада различных факторов (различия между препаратами, различия между испытуемыми, последовательность приёма препаратов, периоды исследования) в наблюдаемую вариативность. Полученная с помощью дисперсионного анализа оценка остаточной вариации использовалась при расчёте доверительного интервала для отношения геометрических средних значений соответствующего параметра. Процедура статистического сравнения состояла в вычислении двусторонних 90%-х доверительных интервалов для отношений соответствующих геометрических средних значений для исследуемого препарата и препарата сравнения.

В данном исследовании были установлены следующие критерии приемлемости: границы оценённого доверительного интервала для AUC_{0-t} или $AUC_{0-\infty}$ находятся в пределах 80–125%; для показателей C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} , $C_{max}/AUC_{0-\infty}$, характеризующихся большей вариативностью, эти пределы составляли 75–133%.

Результаты

В популяцию для оценки фармакокинетических параметров вошли данные 45 добровольцев.

Фармакокинетические параметры тестируемого и референтного препаратов представлены в табл. 2.

Усреднённые фармакокинетические профили концентрации микофеноловой кислоты в плазме крови добровольцев после однократного приёма, тестируемого и референтного препаратов представлены на рис. 3.

Таблица 2

Фармакокинетические параметры тестируемого и референтного препаратов

Параметр	Тестируемый препарат	Референтный препарат
C_{max} , мкг/мл	17,08±6,54 ¹	12,68±5,34
T_{max} , ч	1,50(0,75–4,00) ²	3,00(1,00–4,00)
AUC_{0-t} , мкг/мл·ч	23,49±8,46	22,79±9,75
C_{max}/AUC_{0-t} , ч ⁻¹	0,7510±0,2159	0,5757±0,1699
Примечание: ¹ Среднее арифметическое ± стандартное отклонение (M±SD); ² Медиана (минимальное—максимальное значение).		

Как видно из данных, представленных в табл. 2, среднее значение максимальной концентраций микофеноловой кислоты (C_{max}), определяемой в плазме крови добровольцев при приёме тестируемого препарата, выше аналогичного показателя, наблюдаемого при приёме референтного препарата: для тестируемого препарата данный показатель, составил 17,08 ± 6,54 мкг/мл (диапазон от 5,22 до 29,31 мкг/мл), для референтного — 12,68 ± 5,34 мкг/мл (диапазон от 3,07 до 23,34 мкг/мл). Различия между препаратами по параметру C_{max} являются статистически значимыми ($p = 0,000$, критерий Уилкоксона).

Как было отмечено выше, сравнение фармакокинетических профилей тестируемого и референтного препаратов продемонстрировало несовпадение времён достижения максимальной концентрации. Медианы TC_{max} для тестируемого и референтного препаратов были равны 1,5 ч и 3 ч соответственно. Различия между препаратами по параметру TC_{max} являются статистически значимыми ($p = 0,000$, критерий Уилкоксона).

Сравнение препаратов по площади под фармакокинетической кривой (AUC_{0-t}) показало, что данные показатели у тестируемого и референтного достаточно близки: средние значения AUC_{0-t} составили 23,49 ± 8,46 мкг·ч/мл (диапазон от 8,62 до 42,93) и 22,79 ± 9,75 мкг·ч/мл (диапазон от 6,94 до 50,04) для тестируемого и референтного препаратов соответственно. Различия между препаратами по параметру AUC_{0-t} статистически незначимы ($p = 0,375$, критерий Уилкоксона).

При сравнении тестируемого и референтного препаратов наблюдались следующие показатели скорости всасывания из желудочно-кишечного тракта (C_{max}/AUC_{0-t}): для тестируемого препарата данный пара-

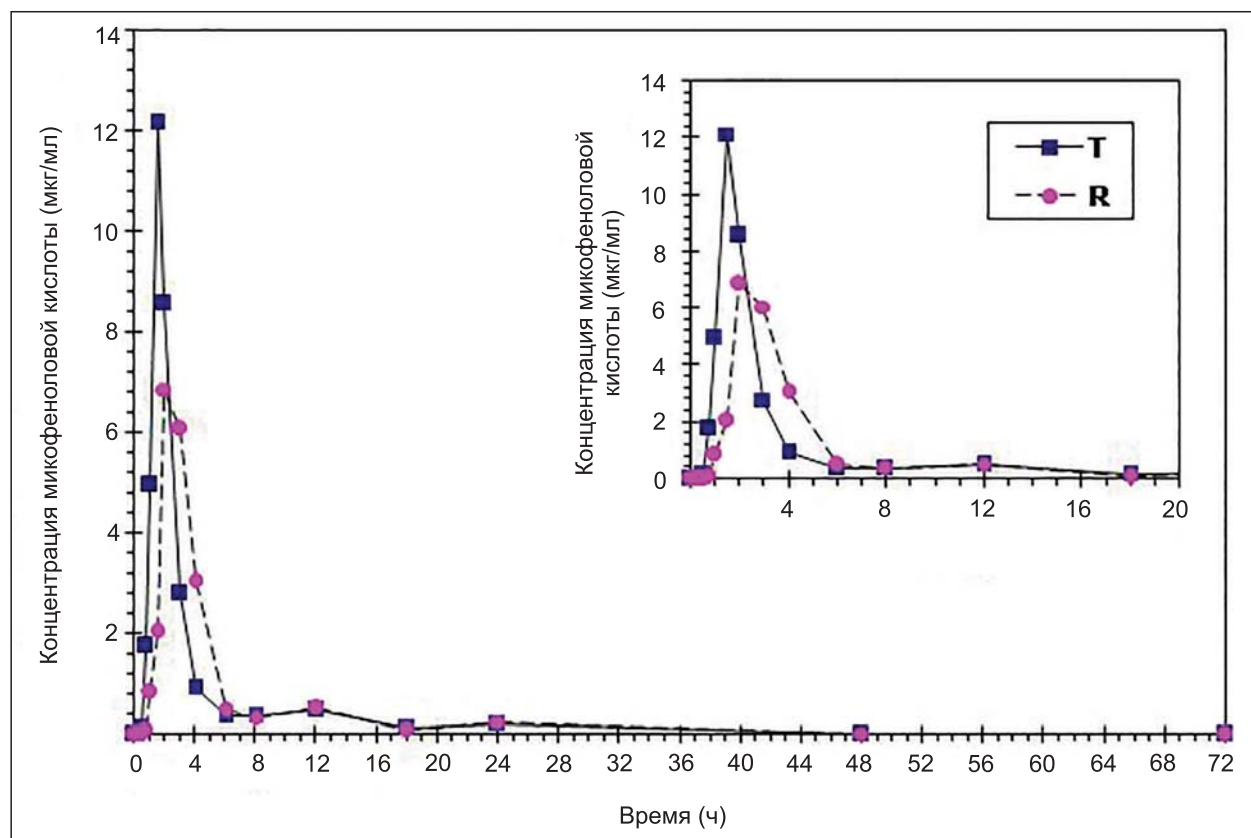


Рис. 3. Усреднённые фармакокинетические профили концентрации микофеноловой кислоты в плазме крови добровольцев после однократного приёма тестируемого (Т) и референтного (R) препаратов

метр ($M \pm SD$) составил $0,7510 \pm 0,2159 \text{ ч}^{-1}$, (диапазон от 0,2549 до 1,2514); для референтного препарата — $0,5757 \pm 0,1699 \text{ ч}^{-1}$, (диапазон от 0,2859 до 0,9939). Приведённые данные позволяют констатировать, что скорость всасывания действующего вещества из таблеток тестируемого препарата превышает аналогичный показатель референтного препарата. Различия между препаратами по параметру C_{\max}/AUC_{0-t} статистически значимы ($p = 0,000$, критерий Уилкоксона).

Среднее геометрическое индивидуальных отношений $AUC_{0-t} (T) / AUC_{0-t} (R)$ (f') составило 105,05%, 90%-й доверительный интервал для логарифмически преобразованных данных: 98,97% — 111,49%, что укладывается в допустимый диапазон границ соответствующего доверительного интервала (80–125%). Среднее геометрическое индивидуальных отношений $C_{\max} (T) / C_{\max} (R)$ (f') составило 136,63%, 90%-й доверительный интервал для логарифмически преобразованных данных: 121,27% — 153,94%, верхняя граница выходит за рамки допустимого диапазона границ соответствующего доверительного интервала (75–133%). Значения коэффициентов внутрииндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров C_{\max} и AUC_{0-t} составили 34,62% и 16,92% соответственно. Среднее геометрическое индивидуальных отношений $(C_{\max}/AUC_{0-t} (T)) / (C_{\max}/AUC_{0-t} (R))$ составило 130,07%, 90%-й доверительный интервал для логарифмически

преобразованных данных: 117,86% — 143,54%, верхняя граница выходит за рамки допустимого диапазона границ соответствующего доверительного интервала (75–133%).

Обсуждение

В результате выполненного исследования были показаны значимые различия фармакокинетики тестируемого и референтного препаратов. Тестируемый препарат характеризуется более высоким уровнем максимальной концентрации (C_{\max}) и более ранним временем её достижения (TC_{\max}): фармакокинетический профиль тестируемого препарата характеризуется ранним «острым» максимумом (см. рис. 3), тогда как профиль референтного препарата демонстрирует более плавное постепенное нарастание концентрации с достижением меньших уровней C_{\max} . Также следует отметить, что тестируемый препарат характеризуется более высокой скоростью всасывания действующего вещества (C_{\max}/AUC). При этом по основному показателю, характеризующему биодоступность действующего вещества из лекарственной формы — площади под фармакокинетической кривой (AUC), препараты не имеют значимых различий.

Доверительные интервалы для отношений геометрических средних значений показателей AUC_{0-t} тестируемого и референтного препаратов соответ-

ствуют допустимым пределам (80–125%), однако границы доверительных интервалов для отношений средних значений показателей C_{\max} и C_{\max}/AUC_{0-t} выходят за допустимые пределы (75–133%). В связи с этим препарат сравнения и тестируемый препарат не могут быть признаны биоэквивалентными.

Причиной различий в фармакокинетике изучаемых препаратов могли стать различия в параметрах технологического процесса. Так, более низкое давление прессования может быть причиной более быстрой дезинтеграции таблетированной формы и, как следствие, более быстрого всасывания действующего вещества.

Причины наблюдаемых различий также могут быть связаны с различиями в составе вспомогательных компонентов, входящих в состав исследуемых лекарственных препаратов. Содержание кукурузного крахмала — дезинтегранта, ускоряющего распад таблеток и скорость высвобождения действующего вещества в тестируемом препарате приблизительно в 3 раза больше, чем в референтном, а содержание связующих веществ повидона и кросс-повидона значительно ниже. Кроме того, содержание основного компонента оболочки — гипромеллозы фталата в исследуемом препарате примерно в 1,5 раза ниже, что также способствует более быстрому растворению оболочки и, следовательно, более быстрому всасыванию микофеноловой кислоты³. Данные различия в составе могли стать основной причиной получения неэквивалентных результатов.

³ Состав тестируемого препарата не разглашается из соображений конфиденциальности.

Вывод

По результатам проведённого исследования сравнительной фармакокинетики оригинальный препарат и тестируемый препарат не могут быть признаны биоэквивалентными по показателям C_{\max} и C_{\max}/AUC_{0-t} . Исследуемый препарат имел более высокое значение максимальной концентрации в плазме и более высокую скорость всасывания по отношению к референтному. Данные различия могут быть обусловлены различным количеством разрыхляющих и связующих веществ.

Литература

1. Salvadori M., Holzer H., Mattos A., Sollinger H., Arns W., Oppenheimer F. et al. Enteric-coated mycophenolate sodium is therapeutically equivalent to mycophenolate mofetil in de novo renal transplant recipients. *Am J Transpl* 2003; 4: 231–236.
2. Budde K., Glander P. Pharmacokinetic principles of immunosuppressive drugs. *Ann Transplant* 2008; 13(3):5–10.
3. Hougardy J.M., Maufort L., Cotton F., Coussement J., Mikhalski D., Wissing K.M. et al. Therapeutic drug monitoring of enteric-coated mycophenolate sodium by limited sampling strategies associated with a high rate of failure. *Clin kidn J* 2016; 3: 1–5.
4. Sobiak J., Resztak M., Glyda M., Szczepaniak P., Chrzanowska M. Pharmacokinetics of mycophenolate sodium co-administered with tacrolimus in the first year after renal transplantation. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2016; 41: 331–338.
5. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International Supple—ments* 2012; 1: 1–126.
6. Guidelines on renal transplantation European Association of Urology 2013, European Association of Urology 2013: 88.
7. Decavele An-S.C., Favoreel N., Heyden F.V., Verstraete A.G. Performance of the Roche Total Mycophenolic Acid assay on the Cobas Integra 400, Cobas 6000 and comparison to LC-MS/MS in liver transplant patients. *Clin Chem and Lab Med* 2011; 49 (7): 1159–65.
8. Руководство по экспертизе лекарственных средств, под ред. Миронова А. Н. Т. 1, М.: Гриф и К, Москва, 2013.